

早稲田大学大学院理工学研究科

博士論文審査報告書

論 文 題 目

両生類副腎皮質刺激ホルモン放出因子およびその受容体に関する研究
Studies of corticotropin-releasing factor
and its receptors in amphibians

申 請 者

氏 名

伊藤 洋一
Yoichi Ito

専攻・研究指導
(課程内のみ)

生命理工学専攻・内分泌学研究

2006 年 2 月

甲状腺ホルモンは脳下垂体が分泌する甲状腺刺激ホルモン (TSH) により制御される。我々は近年ウシガエル (*Rana catesbeiana*) TSH β 鎖の cDNA をクローニングし、予測されるアミノ酸配列の C 末端ペプチドに対する抗体を用いて両生類で初めて TSH 放射免疫測定法 (RIA) を確立した。まず申請者はそれを用いて哺乳類由来の副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (CRF) に顕著な TSH 放出活性があることを示した。次いで申請者は両生類 CRF の構造を決定し、両生類自身の CRF に強い TSH 放出効果があることを明らかにした。さらに CRF の受容体レベルでの解析を行った。

第一章では本研究の背景と目的について述べている。すなわち、これまで哺乳類 CRF を用いて得られた結果を、両生類 CRF を用いて確認すること、そのため両生類 CRF の構造決定し、その合成品を用いたホモログな系で CRF の TSH 放出活性を確かめること、CRF 受容体遺伝子の解析、CRF はどのタイプの受容体を介して TSH 放出を促すか、および CRF は視床下部がもつ TSH 放出活性の主たる因子であるか、などを確かめることである。

第二章ではウシガエル CRF 前駆体をコードする cDNA のクローニングまた同じ *Rana* 属であるヨーロッパトノサマガエル (*R. esculenta*) の CRF の単離精製について、また、カエル CRF (fCRF) に対する抗体の作製とその免疫陽性の分布について述べている。申請者はウシガエル視床下部より抽出した全 RNA を鋳型とし他動物の配列を基に作製したプライマーを用いて、逆転写 PCR を行い CRF 前駆体 cDNA 断片を得、それをプローブとして視床下部 RNA より作製した cDNA ライブラリーから CRF 前駆体の全長をコードする cDNA を単離した。この cDNA 配列より予測されるアミノ酸配列は他動物の CRF 前駆体と 47~69% の相同性を有していた。成熟 CRF とみられる 41 アミノ酸からなる配列は C 末端近くに存在し、他の脊椎動物の CRF と 83~98% の相同性を持ち、脊椎動物を通じて高度に保存されていた。さらに同じ属の *R. esculenta* の脳から HPLC と抗ヒツジ CRF 抗体に対する免疫陽性を指標として 600 pmol の CRF を単離した。得られた CRF の配列はウシガエル CRF 前駆体 cDNA から予測される配列と一致した。そこでこの fCRF を合成し以後の実験に使用した。合成 fCRF をテンガイヘモシアニンと架橋しウサギに免疫し抗血清を得、この抗血清を用いてウシガエル脳を免疫染色したところ、免疫陽性反応を示す細胞体は視索前野に多数みられる他、視床下部腹側核にも存在し、神経末端は正中隆起の下垂体門脈付近に多く認められた。このことから、申請者は CRF が下垂体門脈中に放出され下垂体前葉に運ばれ作用すると推測した。尚、両生類で CRF が単離されたのはこれがはじめてである。

第三章では得られた fCRF が TSH 放出に与える影響について、また、視床下部抽出物が引き起こす TSH 放出に対して CRF 受容体アンタゴニストが与える影響について述べている。ウシガエル下垂体前葉細胞に fCRF またはヒツジ CRF を加え放出される TSH 量を RIA により測定した。この二つの CRF は同程度、

濃度依存的に TSH 放出を促進した。これにより両生類自身の CRF が TSH 放出を促進することが明らかになった。次に視床下部内に存在する CRF がどの程度の TSH 促進効果を担っているのかを調べるための実験を行った。すなわち幼生・成体の視床下部抽出物を別々に下垂体細胞に加え、さらに CRF 受容体アンタゴニスト、 α -helical CRF₉₋₄₁ を加え、放出された TSH 量を測定した。 α -helical CRF₉₋₄₁ は濃度依存的に視床下部抽出物により高められた TSH 放出量を抑制した。視床下部抽出物よりも強い TSH 放出活性を示す濃度の fCRF による TSH 放出を完全に抑える濃度の α -helical CRF₉₋₄₁ は幼生・成体の視床下部抽出物による TSH 放出活性をそれぞれ 56%、43% 抑制した。これにより申請者は両生類視床下部抽出物中に存在する TSH 放出活性は、それに含まれる抑制因の活性を考慮しなければその 50% 近くが CRF、または CRF 関連ペプチドに由来するものと推測した。本研究で申請者は内因性 CRF が TSH 放出活性を有すること、主たる放出活性は CRF か CRF 関連ペプチドに由来することをはじめて明らかにしたことになる。

第四章では CRF 受容体の cDNA クローニングおよび mRNA の発現について述べている。CRF 受容体は 7 回膜貫通型受容体に属し、多くの脊椎動物で 2 つの型の受容体が存在することが知られている。CRF 以外に脊椎動物に存在する CRF 関連ペプチドも CRF 受容体を介して作用するが、受容体の型により結合能が異なることがわかっている。ウシガエル CRF 前駆体 cDNA を単離した時に用いた cDNA ライブラリーを用いて 2 つの型の CRF 受容体の cDNA を単離した。得られた 1 型・2 型 CRF 受容体 cDNA から推測されるアミノ酸配列は 68% の相同性を有し、他の脊椎動物で既に得られている 1 型・2 型 CRF 受容体とはそれぞれ 80% 以上の相同性を示し高度に保存されていた。1 型・2 型 CRF 受容体 mRNA の発現を調べるため、ウシガエルの様々な組織から全 RNA を抽出し、逆転写 PCR を行い解析したところ、1 型 CRF 受容体は脳、下垂体前葉、中・後葉と中枢神経系に発現していた。一方 2 型 CRF 受容体は 1 型 CRF 受容体と同様に中枢神経系にも発現していたが、その他に末梢の多くの組織で発現が見られ、2 型を介しての CRF の多様な生理作用の存在が示唆された。

第五章では CRF の TSH 放出促進を介する受容体の決定について述べている。前章で述べた様に 1 型、2 型 CRF 受容体が共に下垂体前葉に発現していたことから CRF の TSH 放出に関わる CRF 受容体を決定するために、受容体特異性をもつ CRF 関連ペプチドや CRF 受容体アンタゴニストの TSH 放出活性を調べた。CRF 関連ペプチドは両生類皮膚から Sauvagine、魚類尾部下垂体より Urotensin I、ほ乳類脳から 3 種の Urocortin (UCN) が単離されているが、受容体特異性を持つのは UCN II、III で 2 型 CRF 受容体にのみ結合することがわかっている。マウス UCN II、アフリカツメガエル UCN III をウシガエル下垂体細胞培養系に加えると CRF と同様に TSH 放出を促進した。このことから CRF による TSH 放出促進は

2 型 CRF 受容体を介することが示唆された。さらに種々の CRF 受容体アンタゴニストを加え CRF により高められる TSH 放出にどのような影響を与えるか調べた。受容体特異性のないアンタゴニスト **Astressin** および 2 型 CRF 受容体特異的アンタゴニスト **Antisauvagine30** は CRF による TSH 放出促進を濃度依存的に抑制した。しかし、1 型 CRF 受容体特異的アンタゴニスト **Antalarmin** は CRF による TSH 放出活性に効果を示さなかった。これにより申請者は両生類では CRF は 2 型 CRF 受容体を介して TSH 放出を促進していると結論した。

第六章では第三章で視床下部には CRF 以外に TSH 放出を調節する因子が存在することを示唆していることから、他にカエル脳に存在するいくつかの神経ペプチドの TSH 放出活性を調べた結果について述べている。その結果、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP) および血管作動性腸管ポリペプチド (VIP) が TSH 放出を促進することが明らかになった。中でも VIP は顕著な TSH 放出活性を示した。但し、両生類において PACAP 様免疫陽性は正中隆起に存在が示されているが VIP は正中隆起部への投射の報告例が無い。TSH を抑制的に制御する物質としてソマトスタチンについて解析し、TSH 基礎放出には影響を及ぼさないが fCRF により引き起こされた TSH 放出を抑制することを明らかにした。

第七章では本研究の結論と今後の課題について述べている。すなわちウシガエルにおいて CRF のアミノ酸配列を決定し、その CRF が下垂体からの顕著な TSH 放出促進活性を持つこと、視床下部に含まれる TSH 放出活性の約 50% は CRF または CRF 関連ペプチドに由来すること、CRF の TSH 放出活性は 2 型 CRF 受容体を介することが本研究で得られた結論である。当面の課題として CRF が直接 TSH 産生細胞に作用していることを示すため、下垂体の TSH 産生細胞に 2 型 CRF 受容体が発現していることを明らかにすることである。

以上のように申請者は、両生類では TSH 放出が CRF が主たる TSH 放出因子であること、CRF は 2 型受容体を介して TSH 放出を促進すること、ソマトスタチンが TSH 放出抑制因子のひとつであること、これら以外にも TSH 分泌制御には様々な因子が関与していることを明らかにした。申請者は哺乳類と両生類では主たる甲状腺刺激ホルモン調節機構が異なることを明らかにしたが、これは比較内分泌学分野で顕著な業績といえる。よって本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

2006 年 2 月

主査	早稲田大学教授	理学博士（東京大学）	菊山 榮
	早稲田大学教授	理学博士（東京大学）	東中川 徹
	早稲田大学教授	博士（理学）（早稲田大学）	加藤 尚志